






Protein stabilized pharmacologically active agents, methods for preparation thereof and methods for use thereof**Publication number:** CN1237901**Publication date:** 1999-12-08**Inventor:** DESAI NEIL P (US); CHUNLIN TAO (US); YANG ANDREW (US)**Applicant:** VIVORX PHARMACEUTICALS INC (US)**Classification:**

- international: **A61J3/00; A61K9/14; A61K9/38; A61K9/51; A61K45/00; A61K47/30; A61K47/48; A61K49/00; A61P29/00; A61P35/00; A61J3/00; A61K9/14; A61K9/30; A61K9/51; A61K45/00; A61K47/30; A61K47/48; A61K49/00; A61P29/00; A61P35/00;**
(IPC1-7): A61K9/14

- European: A61K9/51

Application number: CN19971099720 19970924**Priority number(s):** US19960720756 19961001**Also published as:**

 WO9814174 (A1)
 WO9814174 (A1)
 EP0961612 (A1)
 EP0961612 (A1)
 EP0961612 (A0)

more >>

[Report a data error here](#)

Abstract not available for CN1237901

Abstract of corresponding document: **WO9814174**

In accordance with the present invention, there are provided compositions and methods useful for the in vivo delivery of substantially water-insoluble pharmacologically active agents (such as the anticancer drug paclitaxel) in which the pharmacologically active agent is delivered in the form of suspended particles coated with protein (which acts as a stabilizing agent). In particular, protein and pharmacologically active agent in a biocompatible dispersing medium are subjected to high shear, in the absence of any conventional surfactants, and also in the absence of any polymeric core material for the particles. The procedure yields particles with a diameter of less than about 1 micron. The use of specific composition and preparation conditions (e.g., addition of a polar solvent to the organic phase), and careful selection of the proper organic phase and phase fraction, enables the reproducible production of unusually small nanoparticles of less than 200 nm diameter, which can be sterile-filtered. The particulate system produced according to the invention can be converted into a redispersible dry power comprising nanoparticles of water-insoluble drug coated with a protein, and free protein to which molecules of the pharmacological agent are bound. This results in a unique delivery system, in which part of the pharmacologically active agent is readily bioavailable (in the form of molecules bound to the protein), and part of the agent is present within particles without any polymeric matrix therein.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

46 -

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

A61K 9/14

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97199720.9

[43]公开日 1999年12月8日

[11]公开号 CN 1237901A

[22]申请日 97.9.24 [21]申请号 97199720.9

[30]优先权

[32]96.10.1 [33]US[31]08/720,756

[86]国际申请 PCT/US97/17157 97.9.24

[87]国际公布 WO98/14174 英 98.4.9

[85]进入国家阶段日期 99.5.14

[71]申请人 维沃 RX 药物公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 内尔·P·代塞 陶春林 安杰·杨

莱斯烈·路易 郑天立 姚志文

帕奇克·苏-雄

什落莫·马格达西

[74]专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 文 琦

权利要求书 8 页 说明书 34 页 附图页数 2 页

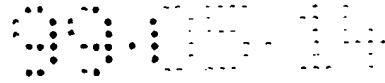
[54]发明名称 蛋白质稳定的药理活性物质及其它的制备和应用方法

[57]摘要

本发明提供了用于体内输送实际上不溶于水的药理活性物质(如抗肿瘤药紫杉醇)的组合物及方法,即药理活性物质以包有蛋白包衣(作为稳定剂)的悬浮颗粒形式输送。特别是,在没有传统的表面活性物质和颗粒的聚合物材料存在的情况下,在生物相容性分散介质中的蛋白和药理活性物质接受高度剪切处理。此过程产生直径小于1微米的颗粒。使用特定组合物和制备条件(如在有机相内加入极性溶剂),并仔细地选择适当的有机相和相组分,可再生出直径小于200nm的极小颗粒,此颗粒可被灭菌过滤。根据本发明制造的颗粒系统可转化为能重新分散的干粉,由包被蛋白的水不溶性药物纳米颗粒和药剂分子所结合的游离蛋白组成。由此形成了独特的输送系统,其中一部分药理活性物质可被稳定地生物利用(以结合蛋白的分子形式),另一部分药剂存在于颗粒内而其中没有任何聚合物基质。

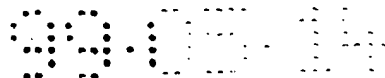
专利文献出版社出版

ISSN 1000-8427 4



权 利 要 求 书

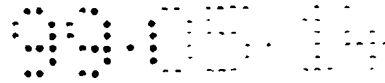
1. 一种供体内输送的实际上水不溶性药理活性物质的制备方法，该方法包括：将一种由含所述药理活性物质并在其中分散的有机相和含可生物适合聚合物的水性介质组成的混合物置于压力范围在大约3,000至30,000磅/英寸²的高压均浆器内，使其经受高剪切条件处理，其中所述混合物实际上不含表面活性剂。
2. 根据权利要求1所述的方法，进一步包括从所述混合物除去所述有机相的步骤。
3. 根据权利要求1所述的方法，进一步包括从所述混合物中除去所述水相的步骤。
4. 根据权利要求1所述的方法，其中所述实际上水不溶性药物活性物质选自药理活性剂，诊断试剂或是营养剂。
5. 根据权利要求4所述的方法，其中所述药理活性剂物质选自止痛药/退烧药、麻醉药、平喘药、抗生素、抗抑郁药、抗糖尿病药、抗真菌药、抗高血压药、抗炎药、抗肿瘤药、抗焦虑药、免疫抑制剂、抗偏头疼药、镇静剂/安眠药、抗心绞痛药、抗精神病药、抗躁狂药、抗心律失常药、抗关节炎药、抗痛风药、抗凝药、溶栓药、抗纤溶药、血液流变学试剂、抗血小板药、抗惊厥药、抗帕金森药、抗组胺药/止痒药、钙调节药、抗菌药、抗病毒药、抗微生物药，抗感染药、支气管扩张药、激素、降糖药、降脂药、蛋白质、核酸、促红细胞生成药、抗溃疡/抗反流药、止恶心药/止吐药、脂溶性维生素，米托坦、visadine、亚硝基脲盐、蒽环类抗生素和玫瑰树碱。
6. 根据权利要求4所述的方法，其中所述药理活性物质剂是一种抗肿瘤药，选自以下药物：盐酸阿霉素、环磷酰胺、放线菌素、博来霉素、正定霉素、阿霉素、表阿霉素、丝裂霉素、氨甲喋呤、氟尿嘧啶、卡铂、卡氮芥(BCNU)、甲基-卡氮芥、顺铂、鬼臼乙叉甙、干



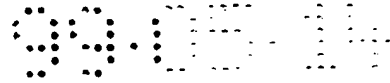
扰素、喜树碱及其衍生物、苯芥胆甾醇、紫杉醇及其衍生物、taxotere 及其衍生物、长春碱、长春新碱、三苯氧胺、鬼臼乙叉甙、哌酰硫烷。

7. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述药理活性物质是一种免疫抑制药，选自环孢菌素、硫唑嘌呤、咪唑立宾或 FK506 (tacrolimus)。
8. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述诊断试剂选自超声造影试剂，放射造影试剂或磁造影试剂。
9. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述营养剂选自氨基酸、糖、蛋白质、碳水化合物、脂溶性维生素、或脂肪、或它们的任意两种或两种以上的混合物。
10. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述有机相的沸点不超过 200 度。
11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述有机相选自豆油、椰子油、橄榄油、红花油、棉籽油、芝麻油、橘油、柠檬油、含有 4~30 碳原子的脂肪烃、环脂烃或芳香烃、含有 2~30 个碳原子的脂肪醇或芳香醇，含有 2~30 个碳原子的脂肪族酯或芳香酯、含有 2~30 个碳原子烷基醚、芳基醚或环醚、含有 1~30 个碳原子的烷基或芳香基卤化物、根据需要含有一个以上卤素取代基，含有 3~30 个碳原子的酮类、聚二醇或它们的任意两种或两种以上的混合物。
12. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述有机相是由实际上与水不相混和的有机溶剂以及水溶性有机溶剂组成的混合物。
13. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述生物适合性聚合物是天然存在的聚合物、合成聚合物，或是它们的混合物。
14. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述生物适合性聚合物能够通过二硫键交联。

15. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述天然聚合物选自蛋白质、肽、多核苷酸、聚多糖、糖蛋白或脂蛋白。
16. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述合成聚合物选自含有半胱氨酸残基和/或二巯基的合成聚氨基酸、游离巯基和/或二巯基修饰的聚乙醇、游离巯基和/或二巯基修饰的聚甲基丙烯酸羟乙酯、游离巯基和/或二巯基修饰的聚丙烯酸、游离巯基和/或二巯基修饰的聚乙基噁唑啉、游离巯基和/或二巯基修饰的聚丙烯酰胺、游离巯基和/或二巯基修饰的聚乙烯吡咯烷酮、游离巯基和/或二巯基修饰的聚二醇、游离巯基和/或二巯基修饰的聚乙交酯、聚己酸内酯或其共聚物、以及它们的任意两种或以上的混合物。
17. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述高剪切条件包括在压力为大约 6,000 到 25,000 磅/英寸²范围的高压匀浆器内将所述有机相与所述水性介质接触的步骤。
18. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述生物适合性聚合物为蛋白质白蛋白。
19. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述水性介质选自水，缓冲水性介质，盐水，缓冲盐水，氨基酸溶液，糖溶液，维生素溶液，碳水化合物溶液或它们的任意两种或两种以上的混合物。
20. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述高剪切条件产生被所述生物适合性聚合物包衣在内的药理活性物质的颗粒。
21. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述颗粒的平均直径小于 1 微米。
22. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述颗粒的平均直径小于 200 纳米。

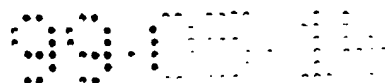


23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中所述混合物经过无菌过滤。
24. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述颗粒为非晶体，结晶或两者的混合物。
25. 根据权利要求 24 所述的方法，其中所述颗粒实际上是非晶态的。
26. 一种将实际上水不溶性药理活性物质输送到有需要的受试者体内的组合物，该组合物由将一种混合物置于压力范围在大约 3,000 至 30,000 磅/英寸²的高压均浆器内使其经受高剪切条件处理而制备的产品组成，该混合物由含有一种药理活性物质分散在其中的有机相和含生物适合性聚合物的水性介质组成，所述混合物实际上不含表面活性剂。
27. 根据权利要求 26 所述的组合物，其中所述有机相从所述混合物中除去。
28. 根据权利要求 26 所述的组合物，其中所述水相从所述混合物中除去。
29. 根据权利要求 26 所述的组合物，其中所述药理活性物质剂是紫杉醇，所述生物适合性聚合物是白蛋白。
30. 根据权利要求 26 所述的组合物，其中所述高剪切条件产生的颗粒由包裹在生物适合性聚合物内的药理活性物质组成。
31. 根据权利要求 30 所述的组合物，其中所述颗粒的平均直径小于 1 微米。
32. 根据权利要求 30 所述的组合物，其中所述颗粒的平均直径小于 200 纳米。
33. 根据权利要求 32 所述的组合物，其中所述混合物经过无菌过滤。



34. 根据权利要求 30 所述的组合物，其中所述颗粒是非晶体，结晶体或两者的混合物。
35. 根据权利要求 34 所述的组合物，其中所述颗粒实际上是非晶态的。
36. 一种制备以可无菌过滤颗粒的形式体内输送实际上水不溶性药理活性物质的方法，该方法包括：将一种混合物置于压力范围在大约 3,000 至 30,000 磅/英寸² 的高压均浆器内使其经受高剪切条件处理，该混合物由分散有该药理活性物质的有机相和含生物适合性聚合物的水性介质组成，所述混合物实际上不含表面活性剂。
37. 根据权利要求 36 所述的方法，进一步包括从所述混合物中去除有机相。
38. 根据权利要求 36 所述的方法，进一步包括将所述混合物通过 0.22 微米滤膜过滤。
39. 根据权利要求 36 所述的方法，进一步包括从所述混合物中去除水相。
40. 根据权利要求 36 所述的方法，其中所述高剪切条件产生非晶体颗粒，结晶颗粒、或两者的混合物。
41. 根据权利要求 40 所述的方法，进一步所述颗粒实际上是非晶态的。
42. 一种用于将实际上水不溶性药理活性物质输送到所需受试者体内的组合物，该组合物含有根据权利要求 36 的方法制备的产品。
43. 一种药物输送系统，包括固体或液体的颗粒、实际上水不溶性药理活性物质，以及蛋白质包衣，其中所述蛋白质包衣具有与其缔合的游离蛋白质，其中该药理活性物质的一部分包含在所述蛋白质包衣中，该药理活性物质的一部分与游离的蛋白质缔合，其中所述颗

- 粒的平均直径不超过约 1 微米。
44. 根据权利要求 43 所述的药物输送系统，其中所述颗粒的平均直径小于 200 纳米。
 45. 根据权利要求 44 所述的药物输送系统，其中所述系统是无菌的。
 46. 根据权利要求 43 所述的药物输送系统，其中所述颗粒是非晶体，结晶体或两者的混合物。
 47. 根据权利要求 46 所述的药物输送系统，其中所述颗粒实际上是非晶态的。
 48. 根据权利要求 43 所述的药物输送系统，其中所述蛋白质外壳悬浮在生物适合性水溶液中。
 49. 将实际上水不溶性药剂输送给受试者的方法，该方法包括将根据权利要求 1 的方法制备的组合物的有效剂量给予所述受试者。
 50. 将实际上水不溶性药剂输送到受试者的方法，该方法包括将根据权利要求 26 的方法制备的组合物的有效剂量给予受试者。
 51. 将实际上水不溶性药剂输送到受试者的方法，该方法包括将有效量的所述药剂作为权利要求 43 中输送系统的一部分给予所述受试者。
 52. 一种减少药剂的骨髓抑制作用的方法，该方法包括将有效量的所述药剂作为权利要求 43 中输送系统的一部分给予所述受试者。
 53. 根据权利要求 52 所述的方法，其中所述药剂是紫杉醇，所述蛋白质为白蛋白。
 54. 一种用含有蛋白质包衣抗肿瘤药的颗粒的、无 cremaphor 的溶瘤剂



消灭癌细胞的方法，其中该蛋白质包衣缔合有游离蛋白质，该抗肿瘤药的一部分包含在蛋白包衣中，该抗肿瘤药的另一部分则与该游离蛋白质缔合，并且该颗粒的平均直径不超过 1 微米。

55. 根据权利要求 54 所述的方法，其中所述颗粒的平均直径小于 200 纳米。

56. 根据权利要求 55 所述的方法，其中所述系统经过无菌过滤。

57. 根据权利要求 54 所述的方法，其中所述颗粒是非晶体，结晶体或两者的混合物。

58. 根据权利要求 57 所述的方法，其中所述颗粒实际上是非晶态的。

59. 根据权利要求 54 所述的方法，其中所述抗肿瘤药是紫杉醇，所述蛋白质是白蛋白。

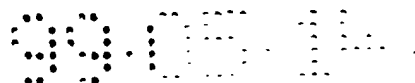
60. 一种包有蛋白质包衣的实际上水不溶性药理活性物质的生物保护颗粒，其中所述颗粒被与之缔合的游离蛋白质包围，该药理活性物质的一部分包含在蛋白质包衣内，该药理活性物质的另一部分则与包围该蛋白质包衣的游离蛋白质缔合，并且该颗粒的平均直径不超过 1 微米。

61. 根据权利要求 60 所述的生物保护颗粒，其中所述颗粒的平均直径小于 200 纳米。

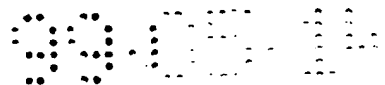
62. 根据权利要求 61 所述的方法，其中所述颗粒经过无菌过滤。

63. 根据权利要求 60 所述的方法，其中所述颗粒是非晶体，结晶体或两者的混合物。

64. 根据权利要求 63 所述的方法，其中所述颗粒实际上是非晶态的。



65. 根据权利要求 60 所述的方法，其中所述药理活性物质是紫杉醇，所述蛋白质是白蛋白。
66. 一种由静脉内导管构成的含有权利要求 26 的组合物的物品。
67. 根据权利要求 66 所述的物品，其中所述组合物含有掺入到以白蛋白为基础的输送系统之中的紫杉醇。
68. 一种减少药剂的肝脏滞留作用的方法，该方法包括将有效量所述药剂作为权利要求 43 的药物输送系统的一部分进行给药。
69. 根据权利要求 68 所述的方法，其中所述药剂是紫杉醇，所述蛋白质是白蛋白。
70. 一种利用含量在 1mg/ml 以上的紫杉醇的剂量溶液将紫杉醇给予所需患者的方法，该方法包括将所述药剂作为权利要求 43 的药物输送系统的一部分进行给药。
71. 一种利用对于每一有效剂量而言总输注量小于 300ml 的含紫杉醇的介质、将紫杉醇给予所需患者的方法，该方法包括将有效量所述紫杉醇作为权利要求 43 的药物输送系统的一部分进行给药。
72. 一种将紫杉醇迅速给予所需患者的方法，该方法包括将有效量所述紫杉醇作为权利要求 43 的药物输送系统的一部分进行给药。



说明书

蛋白质稳定的药理活性物质及其它的制备和应用方法

发明领域

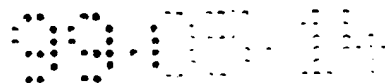
本发明涉及用于静脉内给予药理活性物质的微粒载体的生产方法，以及由此而产生的新组合物。在一个特定的方面，本发明涉及体内输送实际上水不溶性药理活性物质（如抗癌药紫杉醇）的方法。在一个方面，提供含水不溶性药理活性物质的分散胶体系统。这些混悬的颗粒被包封在一种由可生物适合聚合物配制成的聚合物壳体内，其直径小于约 1 微米。本发明胶体系统的制备不需使用常规的表面活性剂或任何聚合物核心基质。本发明现时更着重的一个方面是，提供一种能无菌过滤的极小颗粒的制备方法。聚合物壳体含药理活性物质颗粒和任意选择的生物适合性分散剂，药理活性物质能在其该分散剂中溶解或混悬。因而，本发明提供一种药物输送系统，其形式或者是液体或者是一种可再分散的粉末。任何一种形式不但提供了立即生物有效的药物分子（即与一种蛋白质分子结合的药物分子），而且提供了用一种蛋白质包衣的纯药物颗粒。

发明背景

静脉内药物输送可迅速和直接地与携带药物到身体其余部位的血流达到平衡。为了避免血管内注射后短时间内出现的峰血清浓度，携带于稳定载体内的给药方式可在冲击剂量静注治疗微粒后使药物在血管逐渐释放。

可注射的控释微粒能提供一个预先程序化的作用时间，范围从一次注射后的几天、几周到数月。它们也具有几个比常规给药更为突出的优点，包括自动保证病人对剂量制度的顺从性，以及药物能导向特定的组织或器官 (Tice and Gilley, Journal of Controlled Release 2: 343-352 (1985))。

存在于血液内的微粒和外来物体会被“血液过滤器官”，即肾脏、

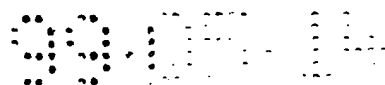


肺和肝逐渐从循环中清除。含于正常全血内的颗粒物质包含有红血细胞 (直径典型地, 为 8 微米)、白血细胞 (直径典型地, 为 6-8 微米) 和血小板 (直径典型地, 为 1-3 微米)。在大多数器官和组织的微循环中能允许这些血细胞自由通过。当尺寸大于 10-15 微米的小血栓 (血凝块) 存在于循环内时, 会出现毛细血管梗塞或阻塞的危险, 导致局部缺血或缺氧和可能的组织死亡。由此, 必须避免在循环内注入直径大于 10-15 微米的颗粒。然而, 直径小于 7-8 微米的颗粒混悬液是比较安全的, 可用于输送以脂质体和乳液、营养剂及显象用造影剂等形式出现的药理活性物质。

颗粒的大小和它们的输送方式决定它们的生物学行为。Strand 等在微球的生物医学应用一书中 (Microspheres-Biomedical applications, ed. A. Rembaum, pp 193-227, CRC Press (1988)) 提到, 颗粒的命运取决于它们的大小。尺寸范围在几纳米 (nm) 到 100 nm 的颗粒在间隙注射后进入淋巴毛细管, 并在淋巴结内可能产生吞噬作用。在静脉内/动脉内注射后, 直径小于 2 微米的颗粒很快会被网状内皮系统 (RES) (也称作单核吞噬细胞系统 (MPS)) 从血液中清除。直径大于 7 微米的颗粒在静注后会被肺毛细管截留。在动脉内注射后, 这些颗粒会被到达的第一个毛细管床截留。吸入的颗粒被肺泡的巨噬细胞捕获。

水不溶性或水溶性差以及对胃内酸环境敏感的药物不能用常规的方法 (如用静注或口服给药的方法) 给予。这种药物的胃肠外给予可通过油溶性药物与水性液体 (如生理盐水) 在有表面活性剂或乳化稳定剂存在下乳化生成的稳定性微乳状液进行。这些乳液可以静脉内注射给药, 条件是乳液的组分是药理学上惰性的。美国专利 4,073,943 提到将水不溶性药理活性物质溶于油, 并用水在有表面活性剂如卵磷脂、多聚醇 (丙二醇和乙二醇的共聚物)、油酸聚甘油酯等的存在下乳化后给予的方法。PCT 国际公布 No.WO85/00011 提到一种麻醉药的药物微小滴用磷脂如肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (肉豆蔻酰卵磷脂) 包衣的方法。它们具有合适的尺寸, 可供皮内或静脉内注射用。

一个水不溶性药物的例子是紫杉醇。它是一种天然产物, 由 Wani



等首先从太平洋紫杉树 *Taxus brevifolia* 分离出 (*J. Am. Chem. Soc.* 93: 2325 (1971))。在抗有丝分裂药中，含一个二萜碳骨架的紫杉醇对引起有丝分裂纺锤体形成的微管蛋白质呈现独特的作用模式。与其它抗有丝分裂药如长春碱或秋水仙碱阻止微管蛋白装配大不相同的是，紫杉醇是唯一一种已知能抑制微管蛋白解聚过程、因而阻止细胞复制过程的植物产品。

紫杉醇这种天然存在的双萜类化合物对药物难治性卵巢癌显示有明显的抗肿瘤和抗癌作用。紫杉醇对范围广泛的肿瘤模型如 B16 黑素瘤、L1210 白血病、MX-1 乳房肿瘤和 CS-1 结肠肿瘤异种移植物有优异的抗肿瘤活性。几份最近的出版物把紫杉醇称为新的抗癌特效药。确实，最近紫杉醇已被联邦药品管理局批准用于治疗卵巢癌。然而，紫杉醇的水溶解度低使对人给药成为问题。确实，输送在水性介质中固有地不溶或难溶的药物，如果口服输送无效可能会受到严重的损害。为此，目前所用的紫杉醇配方需要一种 cremaphor 来使药物增溶。人临床的剂量范围是 200- 500 毫克。这个剂量可溶于 1:1 的乙醇:cremaphor 中，稀释到 1 升静脉内给药液体。现时所用的 cremaphor 是多乙氧基蓖麻油。

在 I 期临床试验中，紫杉醇本身不显示过度的毒性作用，但用于增溶药物的乳化剂引起了严重的过敏反应。目前的给药制度包含在注射药物之前，给予病人抗组胺药和类固醇以减弱 cremaphor 的过敏副作用。

为改进紫杉醇的水溶解度，几个研究人员用能赋予较高水溶解度的官能团修饰了它的化学结构。其中，磺化衍生物 (Kingston et al., U.S. Patent 5,059,699 (1991)) 和氨基酸酯 (Mathew et al., *J. Med. Chem.* 35: 145-151 (1992)) 显示有明显的生物活性。经修饰产生的水溶性衍生物有利于静脉内输送溶解在无害载体如生理盐水中的紫杉醇。然而，这种修饰使药物制剂的成本增加、可能诱发不需要的副反应和/或过敏反应、和/或可能降低药物的疗效。

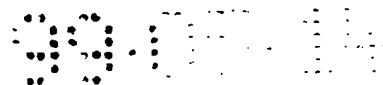
文献曾报道过用蛋白质微球作为药理活性物质或诊断产品的载体。用热变性或化学交联的方法制备了白蛋白微球。热变性微球是从一种乳化的混合物 (例如, 将要掺入的物质白蛋白和一种合适的油) 在温度 100℃ 至 150℃ 之间制备的。然后, 用一种适宜的溶剂将微球洗涤并储存储备用。Leucuta 等 (International Journal of Pharmaceutics 41: 213-217 (1988)) 介绍了热变性微球的制备方法。

制备化学交联微球的过程包括用戊二醛处理乳剂以将蛋白质胶联, 然后洗涤和储存储备用。Lee 等 (Science 213: 233-235 (1981)) 和美国专利 No. 4,671,954 介绍了这种制备方法。

上述制备蛋白质微球作为药理活性物质载体的技术, 虽然适合于水溶性物质的输送, 但它不能捕捉水不溶性物质。这种限制是这些制备技术所固有的, 因为它们依靠在油包水乳剂水相中蛋白质组分的交联或热变性。任何溶解于含蛋白质水相内的水性溶解物质均可能被所形成的交联或热变性蛋白质基质捕捉, 但水溶性差或油溶性物质不能掺入到用这些技术制备的蛋白质基质内。

制备含药纳米颗粒的一种常规方法是将聚乳酸 (或其它可生物适合的水不溶性聚合物) 溶于与水不溶混的溶剂 (如二氯甲烷或其它氯化了的、脂肪、或芳香溶剂) 内, 将药理活性物质溶解于此聚合物溶液中, 在油相或水相中加入表面活性剂, 通过适当的方法形成水包油乳剂, 于真空下将乳剂缓慢蒸发。如油滴足够小并在蒸发时稳定, 就得到一种聚合物的水混悬液。因为药物在开始时就存在于聚合物溶液中, 所以用这种方法可能得到一个组合物, 药物分子在其内被由一种聚合基质形成的颗粒所捕捉。几个研究人员也报告了用溶剂蒸发制备含各种药物的微球和纳米颗粒的方法 (例如参见 Tice and Gilley, Journal of controlled Release 2: 343-352 (1985); Bodmeier and McGinity, Int.J.Pharmaceutics 43: 179 (1988); Cavalier et al., J.Pharm. Pharmacol. 38: 249 (1985); and d'Souza et al., WO 94/10980)。

Bazile 等在 Biomaterials 13: 1093 (1992), 和 Spenlehauer 等在法国专



利 2 660 556 中报告了用 2 种可生物适合聚合物制备纳米颗粒的方法。一种聚合物 (如聚交酯) 与一种活性组分如药物一起溶解于有机相内, 另外一种聚合物如白蛋白用作表面活性剂。经乳化和除去溶剂后, 就形成纳米颗粒, 药物存在于聚交酯颗粒的聚合基质内。

形成聚合基质的聚合物溶液性质对在第一阶段获得适合的乳剂是极为重要的。例如, 聚交酯 (常用于制备可注射用纳米颗粒) 具有一种表面活性, 它能引起其在二氯甲烷-水界面的迅速吸收, 导致界面张力的减弱 (例如参见 Boury et al., Langmuir 11: 1636 (1995)), 从而改善乳化过程。此外, 这些研究人员发现, 牛血清白蛋白 (BSA) 与聚交酯相互作用, 并渗入到在油水界面处的聚交酯单分子层内。由此, 根据上述文献可以预料, 在用常规的溶剂蒸发方法时, 在非水性有机相中存在表面活性聚合物 (聚交酯) 将大大有助于乳化作用。事实上, 聚交酯的存在不仅是一个充分条件, 而且实际上是形成适当大小纳米颗粒所必须的。

基于溶剂蒸发方法的另一个过程包括, 将药物溶解于一种疏水溶剂 (例如, 甲苯或环己烷) 内, 有机相内不需溶解任何聚合物, 在混合物中加入一种常用的表面活性剂作为乳化剂, 生成一种水包油乳剂, 然后将溶剂蒸发, 就得到药物的干燥颗粒 (例如参见 Sjostrom et al., J Dispersion Science and Technology 15: 89-117 (1994))。除去非极性溶剂时, 药物在乳剂滴内沉淀, 从而得到亚微米颗粒。

曾发现, 颗粒的大小主要是受到乳剂滴开始时的尺寸所控制。此外, 令人感兴趣的是, 注意到最终颗粒的大小随着有机相内药物浓度的降低而减少。这一发现与这里所报告的结果相反, 后者在制备纳米颗粒时没有用常规的表面活性剂。此外, Sjostrom 一文的作者注意到, 所用的药物胆甾固醇乙酸酯在甲苯中是有表面活性的, 因而, 可能被定位在油水界面上, 所以在界面上的药物浓度比较高, 从而增加沉淀的潜势。

采用如 Calvo 等在 J. Pharm. Sci. 85: 530 (1996) 中所述的一个沉淀



过程也可以生成亚微米颗粒。此过程是基于将药物 (例如, 吲哚美辛) 和聚合物 (聚己酸内酯) 溶于二氯甲烷和丙酮中, 然后将溶液倒入含一种表面活性剂 (泊洛沙姆 188(Poloxamer 188)) 的水相内, 以生成亚微米大小的颗粒 (216 nm)。然而, 此过程是在无乳剂形成的溶剂浓度下进行的。

发明简述

因此, 本发明的一个目的是, 在一个组合物中以未加修饰的形式输送药理活性物质 (例如, 紫杉醇、紫杉烷、Taxotere 和类似的化合物)。此组合物不会因加入有目前用于药物输送的乳化剂和增溶剂而引起过敏反应。

本发明进一步的目的是, 用选择性地混悬在适宜的可生物适合液体内的微米颗粒或纳米颗粒组合物输送药理活性物质。

本发明的另外一个目的是, 提供一种采用溶剂蒸发技术, 从用蛋白质作为稳定剂的水包油乳剂, 在没有常规表面活性剂存在下, 和在任何聚合物核心材料存在下形成药理活性物质亚微米颗粒 (纳米颗粒) 的方法。

本发明的这些和其它目的通过阅读其说明和权利要求将成为显而易见。

根据本发明, 我们发现, 实际上水不溶性药理活性物质能够以微米颗粒或纳米颗粒输送。这些颗粒的水性混悬液适于胃肠外给药。这种输送模式避免了实际上水不溶性药理活性物质 (例如, 紫杉醇) 必需通过一种含例如乙醇和多乙氧基蓖麻油、并用生理盐水稀释的乳剂给药 (例如参见 Norton et al., Abstracts of the 2nd National Cancer Institute Workshop on Taxol & Taxus, 九月 23-24, 1992)。这种已知组合物的一个缺点是有产生过敏性副作用的趋向。

因而, 根据本发明, 提供了采用溶剂蒸发技术生成药理活性物质纳

米颗粒的方法。它是从一种按照高剪切力条件（例如，超声处理、高压均化，或类似技术）制备的水包油乳剂，不需使用任何常规表面活性剂，和不需使用任何聚合物核心物质以形成纳米颗粒基质来制备的。作为替代，用蛋白质（例如，人血清白蛋白）作为稳定剂。

本发明进一步提供了一种可重复的异常细小、能通过 0.22 微米过滤器无菌过滤的纳米颗粒（直径小于 200 纳米）生成方法。这可以通过将水溶性乳剂（例如，乙醇）加入到有机相内，并通过仔细选择有机相的类型、相组分和有机相内的药物浓度达到。生成的纳米颗粒大小能通过 0.22 微米过滤器过滤这一点是极为重要和有意义的，因为含相当数量任何蛋白质（例如，白蛋白）的配方由于这些蛋白质会热凝固，所以不能用常规方法如压热法灭菌。

根据本发明的另一个实施方案，我们开发了用于体内输送实际上水不溶性药理活性物质的组成。本发明的组合物由含于一个聚合物壳体內的实际上水不溶性药理活性物质（以固体或液体的方式）构成。这种聚合物壳体是一种交联的可生物适合聚合物。然后将聚合物壳体（其中含实际上水不溶性药理活性物质）混悬于一种可生物适合的水性液体內，以供给药用。

本发明进一步提供了一种药物输送系统，一部分药理活性物质分子在其內与蛋白质（例如，人血清白蛋白）结合，由此，在给予哺乳动物时可立即生物有效。其它部分药理活性物质含于用蛋白质包衣的纳米颗粒內。这种含药理活性物质的纳米颗粒以纯有效组分的形式存在，没有用任何聚合物基质稀释。

大量在血液中循环的常见药理活性物质（通过疏水或离子相互作用）与载体蛋白质结合，其中最普通的例子是血清白蛋白。本发明的方法和由此而产生的组合物是在给药前已“预先（通过疏水或离子相互作用）结合”蛋白质的药理活性物质。

目前公开的内容展示了能与人血清白蛋白结合的抗癌药紫杉醇

(Paclitaxel) 上述 2 种生物利用度模式 (例如参见 Kumar et al., Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology 80: 337 (1993))。与紫杉醇相比, 在本发明颗粒内高白蛋白浓度供给了相当数量以白蛋白分子结合形式出现的药物, 而白蛋白也是药物在血流中的天然载体。

此外, 利用人血清白蛋白结合紫杉醇以及其它药物的能力可以提高紫杉醇并入颗粒表面的能力。因为白蛋白出现在胶体药物颗粒 (在除去有机溶剂时形成) 上, 由于电排斥和空间稳定的合并作用, 促进了能长时间稳定的胶体分散体的形成。

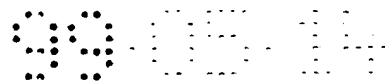
根据本发明, 也提供了能在水或生理盐水中容易重组的粉末形式亚微米颗粒。这种粉末是在除去水分后经冷冻干燥得到的。人血清白蛋白作为本发明纳米颗粒的结构组分, 也作为冷冻保护剂 (抗冻剂) 和重组辅助剂。按照在这里叙述的本发明方法制备的、可通过 0.22 微米过滤器过滤的颗粒, 经干燥或冷冻干燥后产生一种可供静脉内注射用的无菌固体配方。

本发明, 在一个特定方面, 以分散于液体分散体中纳米颗粒的形式或易于重组给药的固体形式提供了抗癌药如紫杉醇的组合物。由于一些药物如紫杉醇的特殊性质, 这种组合物不能用依赖使用表面活性剂的常规溶剂蒸发方法得到。在有各种表面活性剂存在下, 在制备过程后储存几分钟内就会形成极大的药物结晶 (例如, 其大小可从 5 微米左右到几百微米)。这种大小的结晶显然地比静脉内注射所允许的尺寸要大得多。

虽然认识到按本发明所产生的颗粒可以是结晶、无定形物质或它们的混合物, 但通常更愿意选择配方中的药物是无定形的方式。因为这更易于溶解和吸收, 从而达到更高的生物利用度。

附图概述

图 1 显示静脉内给予荷肿瘤小鼠 (每组的 $n=5$) 紫杉醇纳米颗粒的



结果，与接受生理盐水的对照组 (●) 比较，治疗组(■) 小鼠的肿瘤完全消退。观察到对照组有实际上不能控制的肿瘤生长。治疗组的剂量为 20 毫克紫杉醇/公斤，静脉内给予冲击剂量，连续 5 天。

图2显示对脚爪皮下注射胶原诱发关节炎大鼠腹腔给予紫杉醇纳米颗粒的结果。测量爪的体积以表示疾病的严重程度。以治疗开始时爪的体积归一为 100%。0 日表示治疗开始。共分 3 组 — 对照组接受生理盐水 (n=2, 在图上以细线表示, 并标明“非治疗组”), 第 1 治疗组接受紫杉醇纳米颗粒 1 毫克/公斤剂量 (n=4, 在图上以粗线表示, 并标明“紫杉醇纳米颗粒 1.0 毫克/公斤”) 和第 2 治疗组接受紫杉醇纳米颗粒 0.5 毫克/公斤剂量和泼尼松 (prednisone) 0.2 毫克/公斤剂量并用药物治疗 (n=4, 在图上以粗线表示, 并标明“泼尼松 0.2 毫克/公斤 + 紫杉醇纳米颗粒 0.5 毫克/公斤”)。2 个治疗组显示爪体积随时间大幅度减小, 表明关节炎消退, 而对照组在相同期间内爪体积增大了。

发明的详细说明

根据本发明, 提供了供体内输送的实际上水不溶性药理活性制剂的制备方法, 该方法包括:

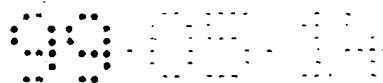
将一种由含上述药理活性物质并在其中分散的有机相和含可生物适合聚合物的水性介质组成的混合物 (在该混合物内实际上不含表面活性剂) 置于压力范围在 3,000 至 30,000 磅/英寸² 的高压均浆器内。在经受高剪切条件处理后, 可以有选择性地从混合物中除去有机相和/或水相。

根据本发明, 也提供用上述方法制备的组合物。

按照本发明的另一个实施方案是, 提供一种由固状或液状、实际上水不溶性药理活性物质经一种蛋白质包衣成颗粒而组成的药物输送系统,

在其中, 上述蛋白质包衣有与其缔合的游离蛋白质,

在其中, 上述药理活性物质的一部分含于上述蛋白质包衣内, 和上述药理性质的另一部分与上述游离蛋白质缔合, 并且上述颗粒的平均



直径不大于 1 微米左右。

已观察到，上述组合物由于它们能提供极低毒性形式的种种药理活性物质而特别有利，例如，紫杉醇和白蛋白（作为可生物适合聚合物）组合由于它的毒性低，是目前优先选择的组合。紫杉醇和白蛋白组合也具有另一个优点，即它实际上没有骨髓抑制作用。

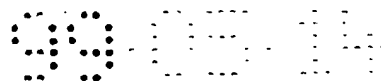
在一种优选的实施方案中，上述颗粒的平均直径不大于 200 纳米左右。这种颗粒由于它们能经受无菌过滤而特别有利，由此可以避免为使含所需药理活性物质的溶液灭菌而需要采用更为强烈的处理方法。

如这里所引用的，“体内输送”这个术语是指经由这样一些给药路线，如口服、静脉内、皮下、腹腔、鞘内、肌内、吸入、外用、经皮、栓剂（直肠）、阴道栓（阴道）和类似途径输送药理活性物质。

如这里所引用的，“微米”这个术语是指一个为一毫米的千分之一的测量单位。

如这里所引用的，“可生物适合”这个术语是指一种物质不会明显地以任何有害的方式改变或影响它被引入的生物系统。

根据本发明，含于聚合物壳体内的药理活性物质与用发明前已知的技术产生的蛋白质微球之间的关键性区别是在颗粒生成之后蛋白质形成的性质和最终状态，及它携带水溶性差或实际上水不溶性物质的能力。根据本发明，聚合物（例如，蛋白质）在高压均浆器的高剪切条件下可能产生交联。采用高剪切以将含溶解或混悬有药理活性物质的分散剂在可生物适合聚合物的水溶液中分散，聚合物可选择性地带巯基或二硫化物基团（例如，白蛋白），由此在非水性介质微小液滴的周围会形成一个交联的聚合物壳体。高剪切条件在液体内会产生空化作用，引起局部高热，从而生成能使聚合物交联的超氧化物离子，例如，通过氧化巯基残基（和/或破坏现存的二硫化物键）以形成新的、交联的二硫化物键。



与本发明大不相同的是，现有用戊二醛交联的方法是非特异性的和与存在于蛋白质结构内任何亲核基团（例如，胺和羟基）基本上是有反应性的。如在现有技术中，热变性能明显地和不可逆地改变蛋白质结构。对比之下，本发明经仔细考虑而提出的形成二硫化物键方法实际上不会使蛋白质变性。此外，实际上含于一个壳体内的水不溶性药理活性物质颗粒亦不同于现有技术产生的交联或热变性蛋白质微球，因为本发明方法产生的聚合物壳体与包衣颗粒的直径相比较薄。经透射电子显微镜测定，对直径为 1 微米（1000 纳米）的包衣颗粒其聚合物包衣的“壳体厚度”约为 25 纳米。与此相比，现有技术产生的微球没有蛋白质壳，但相反地，它的蛋白质是在微球的整个体积内分散。

因而，根据本发明，药理活性物质被溶解在一种适合的溶剂内（例如，氯仿、二氯甲烷、醋酸乙酯、乙醇、四氢呋喃、二氧六环、乙腈、丙酮、二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、甲基吡咯烷酮、或类似溶剂，以及 2 种或 2 种以上这些溶剂的混合物）。在本发明的实际应用中也打算使用另一些溶剂，包括大豆油、椰子油、橄榄油、红花油、棉籽油、芝麻油、橙油、苧烯油、C1-C20 醇、C2-C20 酯、C3-C20 酮、聚乙二醇、脂肪烃、芳香烃、卤代烃和它们的混合物。

与常规的纳米颗粒形成方法不同，聚合物（例如，聚乳酸）是不溶于溶剂内的。在制备本发明组合物所用的油相中，仅含溶于溶剂内的药理活性物质。

其次，在水相中加入蛋白质（例如，人血清白蛋白）是起稳定剂作用，以形成稳定的纳米液滴。加入蛋白质的浓度范围约为 0.05-25% (w/v)，范围在 0.5% - 5% (w/v) 内更好。与常规的纳米颗粒形成方法不同，混合物内不需加入表面活性剂（例如，十二烷基硫酸钠、卵磷脂、吐温 80、多聚醇 F68 和类似化合物）。

其次，乳剂是在高压和高剪切力条件下经均化作用形成的。这种均化作用通常在高压均浆器内进行，典型的操作压力在 3,000 至 30,000 磅/英寸² 的范围内，此过程在 6,000 至 25,000 磅/英寸² 范围内进行更

好。生成的乳剂含极微细的非水性溶剂纳米小滴 (含溶解的药理活性物质) 和极微细的蛋白质稳定剂纳米小滴。可接受的均化方法包括可赋予高剪切和空化作用, 如高压均浆器、高剪切混合器、超声处理器、高剪切搅拌器, 和类似设备。

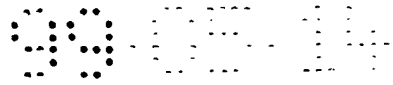
最后, 溶剂于减压下蒸发, 生成由蛋白质包衣的药理活性物质纳米颗粒和蛋白质组成的胶体系统。可接受的蒸发方法包括使用旋转蒸发器、降膜蒸发器、喷雾干燥器、冷冻干燥器, 和类似设备。

将溶剂蒸发后, 液体混悬物可经干燥以得到含药理活性物质和蛋白质的粉末。生成的粉末可于任何合适的时间和在适宜的水性介质中再分散以得到能对哺乳动物给药的混悬液。这些水性介质有生理盐水、缓冲生理盐水、水、缓冲的水性介质、氨基酸溶液、维生素溶液、碳水化合物溶液或类似的介质, 以及任何 2 种以上这些介质的混合物。为得到这种粉末将打算采用的方法包括冷冻干燥、喷雾干燥, 和类似的技术。

根据本发明一个实施方案, 提供了一个形成极为细小的亚微米颗粒 (纳米颗粒), 即直径小于 200 纳米的颗粒的方法。这种颗粒在以液体混悬液方式使用之前能进行无菌过滤。本发明配制过程所得最终产品 (即药物颗粒) 能无菌过滤是有重要意义的, 因为不可能用常规方法如压热器对含高浓度蛋白质 (例如血清白蛋白) 的分散液进行灭菌。

为了得到可无菌过滤的颗粒 (即, 直径小于 200 纳米的颗粒), 将药理活性物质在开始时就以高浓度地溶于一种实际上与水不溶混的有机溶剂内 (例如, 在水中的溶解度小于 5% 左右的溶剂, 如氯仿), 由此生成含药理活性物质的油相。适合的溶剂在上面已提及。与产生纳米颗粒的常规方法不同, 聚合物 (例如, 聚乳酸) 是不溶于溶剂内的。本发明过程所用的油相仅含溶于溶剂内的药理活性物质。

其次, 将一种与水溶混的有机溶剂 (例如, 在水中的溶解度大于 10% 左右的溶剂, 如乙醇) 加入到油相内, 最终浓度在约 1% - 99% v/v 范

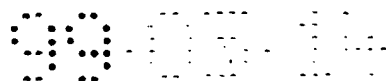


围内，范围约为总有机相的约 5% - 25% v/v 更好。与水溶混的有机溶剂可以从这些溶剂中选择，如醋酸乙酯、乙醇、四氢呋喃、二氧六环、乙腈、丙酮、二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、甲基吡咯烷酮、和类似的溶剂。作为替代，可首先制备水不溶混溶剂与水溶混溶剂的混合物，然后将药理活性物质在此混合物内溶解。

其次，将如上所述的人血清白蛋白或任何其它合适的稳定剂溶于水性介质内。此组分在形成稳定的纳米小滴时起稳定剂作用。可选择性地，将足量的第一种有机溶剂（例如氯仿）溶于水相中，使其接近饱和浓度。将一种单独的、经计量的有机相（现时它包含药理活性物质、第一有机溶剂和第二有机溶剂）加入到饱和的水相内，致使有机相的相组成在约 0.5% - 15% v/v 之间，在约 1% - 8% v/v 之间更好。

其次，于低剪切力下经均化作用形成一种由微米和纳米小滴组成的混合物。这可以通过种种方式来完成，对那些本领域的技术人员是容易认识的，例如，采用一种操作范围在大约 2,000 至大约 15,000 转/分钟的常规实验室均浆器。之后再在高压下（例如，在大约 3,000 至 30,000 磅/英寸²的压力范围）均化。生成的混合物含水性蛋白质溶液（例如，人血清白蛋白）、水不溶性药理活性物质、第一溶剂和第二溶剂。最后，在真空下迅速将溶剂蒸发，即得到一个由极细纳米颗粒（即直径范围在大约 10- 20 毫微米的颗粒）组成的胶体分散系统（药理活性物质和蛋白质），并因而能无菌过滤。颗粒的尺寸范围在大约 50 至 170 纳米之间更好，这取决于配方和操作参数。

根据本发明制备的胶体系统通过除去其内所含的水分，例如，在适宜的温度-时间范围内用真空冷冻干燥方法即可进一步转换成粉末形式。蛋白质（例如人血清白蛋白）本身起冷冻保护剂作用，不需要使用常规冷冻保护剂如甘露糖醇、蔗糖、甘油，和类似的化合物，并且这种粉末通过加入水、生理盐水或缓冲液可以容易地重组。尽管不需要，但当然可以理解为如十分必要，这些常规的冷冻保护剂可以加入到本发明的配方中。



含固态或液态药理活性物质核心的聚合物壳体能够以较小的体积输送高剂量药理活性物质。这可以使病人接受大体积液体时的不适感和住院时间减至最小。此外，聚合物壳体壁或包衣通常在体内可被蛋白水解酶（例如，当聚合物是蛋白质时）完全降解，因此，如同本配方一样，输送系统不会带来副作用。

根据本发明的这一实施方案，实际上水不溶性药理活性物质颗粒的横截面直径不大于 10 微米左右。横截面直径小于 5 微米的颗粒更好，而横截面直径小于 1 微米的，就目前来说是最适于静脉内路线给药的。

计划用于本发明实施的实际上不溶于水的药理活性物质包括：药理活性药物，诊断试剂，营养用物质等。药理活性药物举例如下：

镇痛剂/解热剂（如：阿斯匹林，对乙酰氨基酚，布洛芬，萘普生钠，盐酸叔丁啡，盐酸丙氧酚，萘磺酸丙氧酚，盐酸哌替啶，盐酸二氢吗啡酮，硫酸吗啡，盐酸羟考酮，磷酸可待因，酒石酸二氢可待因，盐酸镇痛新，重酒石酸二氢可待因酮，酒石酸左啡诺，二氟尼酸，水杨酸三乙醇胺，盐酸纳布啡，甲芬那酸，环丁吗喃醇酒石酸盐，水杨酸胆碱，布他比妥，柠檬酸苄苯醇胺，柠檬酸苯海拉明，甲氧异丁嗪，盐酸桂麻黄碱，眠尔通等）；

麻醉剂（如：环丙烷，恩氟烷，氟烷，异氟烷，甲氧氟烷，一氧化氮，普鲁泊福（丙酚），等）；

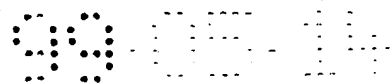
平喘药（如：氮⁷草司汀，酮替芬，Traxanox，等）；

抗生素（如：新霉素，链霉素，氯霉素，头孢菌素，氨比西林，青霉素，四环素等）；

抗抑郁药（如：甲苯噻唑辛，奥昔哌汀，盐酸多虑平，阿莫沙平，盐酸曲唑酮，盐酸阿米替林，麦普替林盐酸盐，硫酸苯乙肼，盐酸去甲丙咪嗪，盐酸去甲替林，硫酸反苯环丙胺，盐酸氟西汀，盐酸多虑平，盐酸米帕明，双羟水杨酸米帕明，去甲替林，盐酸阿米替林，异唑肼，盐酸去甲丙咪嗪，马来酸三甲丙咪嗪，盐酸普罗替林，等）；

抗糖尿病药（如：双胍类，激素，硫酰脲衍生物类，等）；

抗真菌药（如：灰黄霉素，酮康唑，两性霉素 B，制霉菌素，杀念菌



素，等）；

抗高血压药（如：普萘洛尔，普罗帕酮，烯丙氧心安，硝苯吡啶，利血平，樟脑磺酸咪噻芬，盐酸酚苄明，帕吉林盐酸盐，脱甲氧利血平，二氮嗪，硫酸胍乙啶，长压定，萝芙木碱，硝普钠，缓脉灵，蛇根混合碱，甲磺酸酚妥拉明，利血平，等）；

抗炎药（如：（非甾体类）消炎痛，萘普生，布洛芬，ramifenazone，炎痛喜康，（类固醇类）皮质酮，地塞米松，氟噁米松，氢化可的松，强的松龙，强的松，等）；

抗肿瘤药（如：盐酸阿霉素，环磷酰胺，放线菌素，博来霉素，正定霉素，阿霉素，表阿霉素，丝裂霉素，甲氨喋呤，5-氟尿嘧啶，卡铂，卡氮芥（BCNU），甲基-CCNU，顺铂，鬼臼乙叉甙，干扰素，喜树碱及其衍生物，苯芥胆甾醇，紫杉酚（Taxol）及其衍生物，taxotere 及其衍生物，长春碱，长春新碱，三苯氧胺，鬼臼乙叉甙，哌酰硫烷，等）；

抗焦虑药（如：氯羟去甲安定，盐酸丁螺环酮，环丙二氮草，盐酸利眠宁，去甲羟安定，安定羧酸钾盐，安定，双羟萘酸羟嗪，盐酸羟嗪，阿普唑仑，氟哌利多，哈拉西泮，芬那露，丹曲林，等）；

免疫抑制剂（如：环孢菌素，硫唑嘌呤，咪唑立宾，FK506（tacrolimus），等）；

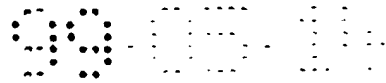
抗偏头痛药（如：酒石酸麦角胺，盐酸萘心安，半乳糖二酸异美汀，二氯醛安替比林，等）；

镇静剂/催眠剂（如：巴比妥类（如戊巴比妥，戊巴比妥钠，司可巴比妥钠），苯二氮草类（如氟西洋盐酸盐，三唑仑，托马西洋（tomazepam），咪达唑仑盐酸盐，等））；

抗心绞痛药（如： β -肾上腺能拮抗剂，钙通道阻滞剂（如：硝苯吡啶，盐酸硫氮卓酮，等），硝酸盐类（如：硝酸甘油，硝酸异山梨醇酯，硝酸戊四醇酯，丁四硝酯，等））；

抗精神病药（如：氟哌啶醇，琥珀酸洛沙平，盐酸洛沙平，硫利哒嗪，盐酸甲硫哒嗪，替沃噻吨，盐酸氟奋乃静，氟奋乃静癸酸酯，氟奋乃静庚酸酯，盐酸三氟拉嗪，盐酸氯丙嗪，奋乃静，柠檬酸锂，丙氯拉嗪，等）；

抗躁狂药（如：碳酸锂）；



抗心律失常药（如：溴苄胺甲苯磺酸盐，艾司洛尔盐酸盐，盐酸维拉帕米，乙胺碘呋酮，恩卡胺盐酸盐，地高辛，洋地黄毒甙，盐酸美西律，吡二丙胺磷酸盐，盐酸普鲁卡因胺，硫酸奎尼丁，葡萄糖酸奎尼丁，奎尼丁聚半乳糖醛酸盐，醋酸氟卡胺，盐酸妥卡胺，盐酸利多卡因，等）；

抗关节炎药（如：保泰松，舒林酸，青霉胺，水杨酰水杨酸，炎痛喜康，硫唑嘌呤，消炎痛，甲氯灭酸钠，硫代苹果酸金钠，苯酮苯丙酸，金诺芬，硫代葡萄糖金，痛灭定，等）；

抗痛风药（如：秋水仙碱，别嘌醇，等）；

抗凝剂（如：肝素，肝素钠，华法令钠，等）；

血栓溶解剂（如：尿激酶，链激酶，重组纤溶酶原激活剂，等）；

抗纤溶剂（如氨基己酸）；

血液流变学药物（如己酮可可碱）；

抗血小板药物（如：阿斯匹林，安匹林，ascriptin，等）；

抗惊厥药（如：丙戊酸，二丙戊酸钠，苯妥英，苯妥英钠，氯硝安定，去氧苯比妥，苯巴比妥，苯巴比妥钠，卡马西平，异戊巴比妥钠，甲琥胺，甲基巴比妥，甲基苯巴比妥，美芬妥英，苯琥胺，对甲双酮，乙苯妥英，苯乙酰脲，司可巴比妥钠，氯氮草二钾，三甲双酮，等）；

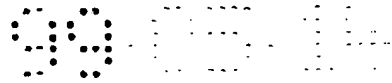
抗巴金森药物（如：乙琥胺等）；

抗组胺药/止痒剂（如：盐酸羟嗪，盐酸苯海拉明，扑尔敏，马来酸溴苯吡胺，盐酸赛庚啶，特非那丁，富马酸氯苯苄咯，盐酸吡咯胺，马来酸卡比沙明，盐酸二苯拉林，酒石酸苯茛胺，马来酸哌吡庚啶，苄吡二胺，马来酸右旋氯苯吡胺，盐酸甲地嗪，酒石酸异丁嗪，等）；

用于钙调节的药物（如：降血钙素，甲状旁腺素，等）； 柞

抗菌素（如：硫酸丁胺卡那霉素，氨曲南，氯霉素，棕榈酸氯霉素，琥珀酸氯霉素钠，盐酸环丙沙星，盐酸克林霉素，棕榈酸克林霉素，磷酸克林霉素，甲硝唑，盐酸甲硝唑，硫酸庆大霉素，盐酸林可霉素，硫酸妥布拉霉素，盐酸万古霉素，硫酸多粘菌素 B，多粘菌素 E 甲磺酸钠，硫酸多粘菌素 E，等）；

抗病毒药物（如：γ干扰素，叠氮胸苷，盐酸金刚烷胺，利巴韦林，



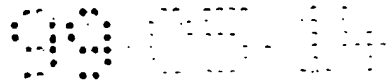
无环鸟苷，等）；

抗微生物药物（如：头孢菌素（如：头孢唑啉钠，头孢拉定，头孢克
罗，头孢匹林钠，头孢唑肟钠，头孢哌酮钠，头孢替坦二钠，头
孢呋肟酯，头孢噻肟钠，一水合头孢羟氨苄，头孢他啶，头孢氨
苄，头孢噻吩钠，盐酸一水合头孢氨苄，头孢孟多钠，头孢西丁
钠，头孢尼西钠，头孢雷特，头孢三嗪钠，头孢他啶，头孢羟氨
苄，头孢拉定，头孢呋新钠，等），青霉素类（如：氨苄西林，
阿莫西林，苄星青霉素 G，邻氯青霉素，氨苄青霉素钠，青霉素 G
钾，青霉素 V 钾，氧哌嗪青霉素钠，苯唑青霉素钠，盐酸氨苄青
霉素碳酯，邻氯青霉素钠，替卡西林钠，阿洛西林钠，羧苄青霉
素钠卡茛西林，青霉素 G 钾，普鲁卡因青霉素 G，甲氧西林钠，
新青霉素 III 钠，等），红霉素类（如：琥乙红霉素，红霉素，无
味红霉素，乳糖醛酸红霉素，红霉素硬脂酸酯，琥乙红霉素，等），
四环素类（如：盐酸四环素，盐酸强力霉素，盐酸二甲胺四环素，
等），等）；

抗感染剂（如：GM-CSF）；

支气管扩张剂（如：拟交感神经类（如：盐酸肾上腺素，硫酸异丙喘
宁，硫酸特布他林，乙基异丙肾上腺素，甲磺酸乙基异丙肾上腺
素，盐酸乙基异丙肾上腺素，硫酸舒喘灵，舒喘灵，甲磺酸双甲
苯苄醇，盐酸异丙肾上腺素，硫酸特布他林，酒石酸肾上腺素，
硫酸异丙喘宁，肾上腺素，酒石酸肾上腺素），抗胆碱能药（如：
溴化异丙托品），黄嘌呤类（如：氨茶碱，喘定，硫酸异丙喘宁，
氨茶碱），肥大细胞稳定剂（如：色甘酸钠），吸入皮质激素类
（如：氟尼缩松倍氯米松，一水合二丙酸倍氯米松），舒喘灵，
二丙酸倍氯米松（BDP），溴化异丙托品，喘乐宁，酮替芬，沙
米特罗，xinafoate，硫酸特布他林，去炎松，氨茶碱，萘多罗米钠，
硫酸异丙喘宁，舒喘灵，氟尼缩松，等）；

激素（如：雄性激素类（如：达那唑，环戊丙酸睾酮，氟甲睾酮，乙
基睾酮，庚酸睾酮，甲基睾酮，氟甲睾酮，环戊丙酸睾酮），雌
激素类（如：雌二醇，雌酮，结合雌激素），孕酮类（如：醋酸
甲氧孕酮，醋酸炔诺酮），皮质类固醇类（如：去炎松，倍他米松，
磷酸倍他米松钠，地塞米松，磷酸地塞米松钠，醋酸地塞米松，



强的松，甲基强的松龙悬液，去炎松缩酮，甲基强的松龙，磷酸强的松龙钠，琥珀酸甲基强的松龙钠，琥珀酸氢化考的松钠，琥珀酸甲基强的松龙钠，六氯化曲安缩松，氢化可的松，环戊丙酸氢化可的松，强的松龙，醋酸氟化可的松，醋酸帕拉米松，强的松龙叔丁乙酯，强的松龙醋酸酯，强的松龙磷酸钠，琥珀酸氢化可的松钠，等），甲状腺激素类（如：左旋甲状腺素钠，等），等）；

降糖药物（如：人胰岛素，纯化牛胰岛素，纯化猪胰岛素，优降糖，氯磺丙脲，格列吡嗪，甲磺丁脲，甲磺氮草脲，等）；

降脂药物（如：安妥明，右旋甲状腺素钠，丙丁酚，美降脂，烟酸，等）；

蛋白质（如：脱氧核糖核酸酶，藻酸酶，超氧化歧化酶，脂肪酶，等）；

核酸（如：编码任何治疗用蛋白质的正义或反义核酸，包括这里提到的任何蛋白质，等）；

用于刺激红细胞生成的药物（如：红细胞生成素）；

抗溃疡/抗返流药物（如：法莫替丁，甲氰咪胍，盐酸雷尼替丁，等）；

抗恶心/止吐药物（如：盐酸美克洛嗪，大麻隆，丙氯拉嗪，承晕宁，盐酸异丙嗪，硫乙哌丙嗪，东莨菪碱，等）；

脂溶性维生素（如：维生素 A，D，E，K，等）；

还有其它药物如：米托坦，visadine，亚硝脲盐，蒽环类抗生素，甲基羟基玫瑰树碱，等。

计划用本发明实施诊断药剂的实例包括制备如超声诊断造影剂、放射造影剂（如碘化辛烷、卤烃、肾造影素等）、核磁共振造影剂（如碳氟化物、脂溶性的顺磁化合物等）及其如果不经物理或化学修饰改变其实际上不溶于水的特性就难以输送的诊断药剂。

计划用于本发明实施的营养性药品的实例包括氨基酸、糖、蛋白质、碳水化合物、脂溶性维生素（例如维生素 A、D、E、K 等）、或脂肪、或它们的任意两种或多种物质的混合物。

本项发明的实施中，许多生物相容性的聚合物可以用来制备聚合物

外壳，包裹在不溶于水的药理活性药物的外部。实际上任何一种聚合物，天然的或是人工合成的，只要能根据需要在其结构内含有巯基或二硫键，就可以用于在实际上不溶于水的药理活性药物的周围形成一层二硫键交联外壳。巯基或二硫键可预先存在于聚合物结构中或可以通过适当的化学修饰导入。例如天然存在的聚合物如蛋白质、肽、多核苷酸、多聚糖（如淀粉、纤维素、葡聚糖、褐藻胶、脱乙酰壳多糖、果胶、透明质酸等）、蛋白多糖、脂蛋白等均是用这种修饰的候选者。

作为稳定剂计划用于本发明的蛋白类包括白蛋白（含有 35 个半胱氨酸）、免疫球蛋白、酪蛋白、胰岛素（含有 6 个半胱氨酸）、血红蛋白（每一个 $\alpha_2\beta_2$ 单位有 6 个半胱氨酸残基）、溶菌酶（含有 8 个半胱氨酸残基）、免疫球蛋白、 α -2-巨球蛋白、纤维连接素、玻璃连接素 纤维蛋白原、脂肪酶等。其中蛋白质、肽、酶、抗体及其它们的混合物是本发明常规用的稳定剂。

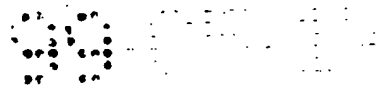
目前用于制备聚合物外壳的优选的蛋白质是白蛋白。象 α -2-巨球蛋白（一种周知的调理素）这样的蛋白质，可以用于增强巨噬样细胞对外壳包裹的实际上水不溶性药理活性物质颗粒的摄取，或可以促进这种外壳包裹颗粒进入到肝脏和脾脏。特异抗体也可以用来将这些纳米颗粒导向到特定部位。

同样，含有半胱氨酸残基的合成多肽也是在实际上水不溶性药理活性物质的外周形成外壳的良好的候选者。另外，聚乙烯醇、聚羟乙基异丁烯酸酯、聚丙烯酸、聚乙基噁唑啉、聚丙烯酰胺和聚乙烯吡咯烷酮等均是化学修饰（如引入巯基和/或二硫键），和形成外壳（如引起交联）的良好候选者。所以，计划用于本发明实施的这些材料的例子是，含有半胱氨酸残基和/或二硫键的合成多氨基酸；聚乙烯醇，经修饰后含有自由巯基和/或二硫键；聚羟乙基异丁烯酸酯，经修饰后含有自由巯基和/或二硫键；聚丙烯酸，经修饰后含有自由巯基和/或二硫键；聚乙 恶唑啉，经修饰后含有自由巯基和/或二硫键；聚丙烯酰胺，经修饰后含有自由巯基和/或二硫键；聚乙烯吡咯烷酮，经修饰后含有自由巯基和/或二硫键；聚二醇，经修饰后含有自由巯基和

[illegible]

计划用于本发明的有机介质的特别优选的混合物一般要求其沸点不大于约 200℃，并且含有易挥发液体如二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯、苯等（即对药理活性物质具有高度的溶解性，并可溶于其它被使用的有机介质，以及高分子量的有机介质（不易挥发）。当加入到其它有机介质时，这些挥发性添加剂有助于增强药理活性物质在有机介质中的溶解度。这一步很耗时，然而很必须。待药物后，可将易挥发组分蒸发（可在真空中）。

本领域的技术人员能够认知，在本发明范围和精神范围内，可以进



行多种变化。聚合壳内的有机介质可以变化，在聚合壳壁的形成中可以使用多种不同的药理活性物质，并且可以使用多种蛋白质以及其它天然或者合成的聚合物。这些用途也是相当广泛的。除生物医学（例如药物的输送、诊断试剂（用于造影）、人造血和肠外营养剂）外，本发明的该聚合壳结构还可以加入到化妆品用途中，例如皮肤护理霜或护发产品、香水香料中使用，压力敏感性墨水中等。

通过参照以下非限定性实施例进一步详细说明本发明。

实施例 1 用高压匀浆制备纳米颗粒

将 30mg 紫杉醇 (Paclitaxel) 溶于 3.0ml 二氯甲烷。溶液中加入 27.0ml 人血清白蛋白 (1% w/v)。混合物在低 RPM 下匀浆 5 分钟 (Vitris 匀浆器, 型号: Tempest I.Q.) 以形成粗制乳化液, 然后将其转移到高压匀浆器内 (Avestin)。乳化在 9000-18000 磅 / 英寸² (psi) 下进行至少再循环 5 次。将得到的系统放到回转 (Rotary) 蒸发器内, 在 40℃ 减压下 (30mmHG) 蒸发 20-30 分钟除去二氯甲烷。得到的分散液为半透明, 紫杉醇颗粒的直径一般为 160-220 (Z-平均, Malvern etasizer)。

将分散液冷冻干燥 48 小时, 不加任何防冻剂。所得饼块加入无菌水或生理盐水后很易再构成原来的分散液, 再构成后颗粒大小与冷冻干燥前相同。

实施例 2 用超声波处理制备纳米颗粒

本实施例的目的是证明利用超声波处理中的空化作用和高剪切应力制备紫杉醇纳米颗粒。将 20mg 紫杉醇溶于 1.0ml 二氯甲烷中。溶液中加入 4.0ml 人血清白蛋白溶液 (5% w/v)。将混合物在低 RPM 下匀浆 5 分钟 (Vitris 匀浆器, 型号: Tempest I.Q.), 形成粗制乳剂, 然后将其转移到 40kHz 的超声处理池内。在 60-90% 的功率, 0 级下超声处理 1 分钟 (550 Sonic Dismembrator)。然后将混合物转移到回转蒸发器内, 在 40℃ 减压下 (30mmHg) 蒸发 20-30 分钟, 除去二氯甲烷。得到紫杉醇微粒, 其直径一般为 350-420nm (Z-平均, Malvern

etasizer)。

将分散液冷冻干燥 48 小时，不加任何防冻剂。所得饼块加入无菌水或生理盐水后很易再构成原来的分散液，再构成颗粒大小与冷冻干燥前相同。

实施例 3 用传统的表面活性剂和蛋白质得到大型结晶

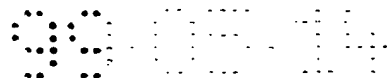
以下实施例说明在传统的溶剂蒸发方法中加入表面活性剂的效果。用实施例 1 同样的方法，但在有机溶剂中加入如吐温 80 (1%- 10%) 这类的表面活性剂，进行了一系列实验。发现在除去二氯甲烷后，得到在光学显微镜和偏振光下可见的大量紫杉醇结晶，其平均大小为 1-2 微米。结晶在几小时内聚集形成非常大的针状晶体，大小为约 5-15 微米。用其它常用的表面活性剂如 Pluronic F- 68、Pluronic F 127、Cremophor EL 和 Brij 58 等均可观察到上述现象。

从上述结果可以得出：如没有聚合物芯体，用传统的溶剂蒸发法即在极性溶剂（如二氯甲烷）中用表面活性剂和蛋白质（如白蛋白），不适于形成亚微药物（紫杉醇）颗粒。

例 4 单独用传统的表面活性剂得到大型结晶

本实施例说明对溶于水不相容的极性溶剂（如氯仿）的生理活性物质而言，在没有聚合物芯体材料时，用传统表面活性剂方法不可能形成纳米颗粒。

将 30mg 紫杉醇溶于 0.55ml 氯仿和 0.05ml 乙醇中。将溶液加入 29.4ml 事先用 1%氯仿饱和的吐温 80 溶液 (1% w/v)。混合物在低 RPM 下匀浆 5 分钟 (Vitris 匀浆器，型号：Tempest I.Q.) 形成粗乳剂，然后转移到高压匀浆器内 (Avestin)。乳化在 9,000-18,000 磅 / 英寸² 时开始进行，至少进行 6 个循环。将得到的系统放入回转蒸发器内，在 40℃减压下 (30mmHg) 蒸发 15-30 分钟，迅速除去氯仿。得到的分散剂不透明，含有药物的大型针状结晶。在偏振光下观察到结晶最初的大小为 0.7-5 微米。分散剂在室温放置几小时，结晶的尺寸进一步



将上述无菌分散剂在无菌条件下分装到无菌玻璃小瓶冷冻干燥，不加任何防冻剂。将无菌水或生理盐水加入所饼块中，即可使其复原到原来的分散剂。复原后颗粒大小与冷冻干燥前一样。

实施例 7 有机溶剂的相组分对颗粒大小的影响

本实施例说明在反应体系中有有机溶剂异常低的相组分的重要性。

除了改变有机溶剂的相组分，以及在有机相内将乙醇含量保持在 10%v/v 之外，按照实施例 5 相同的步骤进行一系列实验，结果发现相组分增加的将导致颗粒尺寸的显著增加。相组分为 4% v/v 时（在饱和浓度以上或 5% v/v 总氯仿浓度），所得颗粒直径为 250nm；当相组分为 3% v/v 时，颗粒直径为 200nm；当有相组分为 2 v/v 时，颗粒直径为 150nm。

很明显，只有在非常低的相组分下制备的颗粒才能无菌滤过。

实施例 8 药物浓度对颗粒大小的影响

本实施例说明有机相内药物浓度的作用。进行了两个实验，其中有机相内紫杉醇浓度分别为 50 mg/ml 和 75 mg/ml，而其它参数与实施例 3 相同。结果发现在低药物浓度下得到直径大约为 150nm 的颗粒，而那些在高药物浓度下制备的颗粒直径更小，即 130-138nm。进行同样的实验，但将有机相中乙醇浓度设定在大约 50%，观察到类似的倾向，即当药物浓度分别为 25 mg/ml 和 50mg/ml 时，颗粒直径分别为 210nm 和 156nm。

这些发现对于在表面活性剂存在下纳米颗粒的形成，与 Sjostrom 等报告的正好相反。

实施例 9 用模型药物制备纳米颗粒

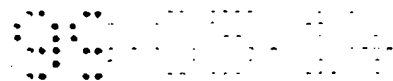
将 30mg 异利血平 (Isoreserpine 一种模型药物) 溶于 3.0ml 二氯甲烷。将溶液加入到 27.0ml 人血清白蛋白溶液 (1% w/v)。混合物在低 RPM 下匀浆 5 分钟 (Vitris 匀浆器, 型号: Tempest I.Q.) 形成粗乳剂, 然后将其转移到高压匀浆器内 (Avestin), 乳化在 9000-

99-05-14

实施例 10 用模型药物制备极小颗粒

将分散液冷冻干燥 48 小时，不加任何防冻剂。所得饼块加入无菌水或生理盐水后很易再构成原来的分散液，再构成颗粒大小与冷冻干燥前相同。

将 30mg 紫杉醇到 0.6ml 乙醇中。在此浓度下 (50mg/ml), 紫杉醇不能完全溶解, 形成过饱和分散剂。将该分散剂加入到 29.4 ml 人血清白蛋白溶液 (1% w/v)。将混合物在低 RPM 下匀浆 5 分钟 (Vitris 匀浆器, 型号: Tempest I.Q.), 使之形成粗乳剂, 再将乳剂转移到高压匀浆器内 (Avestin)。乳化在 9,000-18,000psi 下进行, 至少进行 6 个循环。得到的体系放到回转蒸发器内, 在 40℃减压 (30mmHg)



下蒸发 15-30 分钟以使乙醇快速挥发。所得分散剂的颗粒大小不一，从 250nm 到几个微米不等。

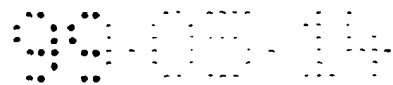
在显微镜下能观察到紫杉醇大颗粒和典型的针状结晶，这些颗粒太大，不能用于静脉内注射。本实验表明，在本发明方法中使用能自由地溶于水的溶剂（如乙醇），将形成大型颗粒，其粒径分布非常广泛，因此这种溶剂不能单独用于本发明。因此，当用于溶解或分散药物成分时，本发明的方法特别排除单独使用水相容溶剂。所以本发明方法如果要用这类溶剂，则必须将其与一些基本上不溶于水的溶剂混合使用，以便能够得到本发明的纳米颗粒。

实施例 1 2 单独使用含有溶解药物的水相容溶剂—不适合于本发明方法

将 30mg 紫杉醇分散到 1.3ml 乙醇中。在此浓度下（大约 24.5mg/ml），紫杉醇能完全溶解于乙醇。将溶液内再加入 28.7 ml 人血清白蛋白溶液（1% w/v）。将混合物在低 RPM 下匀浆 5 分钟（Vitris 匀浆器，型号：Tempest I.Q.），使之形成粗乳剂，然后将乳状液转移到高压匀浆器内（Avestin），乳化在 9000-18000psi 下进行，至少进行 6 个循环。将所得体系放到回转蒸发器内，在 40℃减压（30mmHg）下蒸发 15-30 分钟以使乙醇快速挥发。得到的分散剂的颗粒大小范围非常宽，从 250nm 到几个微米不等。在显微镜下可观察紫杉醇的大颗粒和典型的针状结晶的存在。这些颗粒对于静脉内注射太大。

本实施例和实施例 1 1 声明，在本发明方法中使用能自由地溶于水的溶剂（如乙醇）将导致形成粒径分布非常广泛的大型颗粒，因此这种溶剂不能用于本发明。因此，当用于溶解或分散药物成分时，本发明特别排除水相容溶剂的单独使用。本发明的方法如果需要用这类溶剂，则必须将其与一些基本上不溶于水的溶剂混合使用，以便能够形成本发明的纳米颗粒。

实施例 13 用 X-线粉末衍射法确定纳米颗粒形态中的紫杉醇的物理状态



紫杉醇粗原料通常为针状结晶，其大小一般在 5-500 微米之间。如果存在的结晶的大小在几微米以上，用于静脉内给药的药物制剂中结晶的存在是明显有害的，因为它将有可能堵塞毛细血管。另外，药物结晶的溶解性一般比无定形药物小，这样就降低了静脉内用药的生物利用率。而且随着制剂内药物的装载量增加，结晶化的倾向也随之增加。因此，制剂中含有基本上无定形状的药物很有益的。

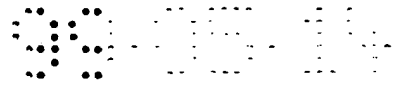
X 线粉末用于测定冷冻干燥粉末制剂中紫杉醇的结晶体或非结晶体的性质。对以下样品进行了分析：样品 1 - 紫杉醇粉末，样品 2 - 冷冻干燥血清白蛋白，样品 3 - 紫杉醇 + 白蛋白的物理混合物，样品 4 - 紫杉醇制剂。每一样品用 $\text{CuK}\alpha$ 放射线进行 X-线照射，角度从 $2^\circ - 70^\circ 2\theta$ ，加速电压为 40KeV/30mA，每步大小为 $0.05^\circ 2\theta$ ，每步数据获得时间为 2.0 秒。样品 1 显示典型的晶体样品的强峰，最强的峰位于 $5.1^\circ 2\theta$ 。样品 2 显示无定形物典型的宽驼峰。样品 3 显示样品 2 的大的宽驼峰，此外可见到 $5.1^\circ 2\theta$ 处的紫杉醇峰。样品 4 的紫杉醇制剂显示没有紫杉醇结晶的特性，其图形同样品 2，这说明用本发明的制剂中存在实际上为无定形的药理活性物质。

根据本发明制备的纳米颗粒的无定形性质与其它记载在现有技术中方法制备产品形成鲜明的对比。例如记载在美国专利 5, 145, 684 (Liversidge 等)，以及 Liversidge-Merisko 等在药剂学研究杂志 13(2):272-278(1996) 上发表的研磨方法产生实际上的结晶产品。

实施例 14 用紫杉醇纳米颗粒对肿瘤动物模型的治疗

按照实施例 1 方法制备紫杉醇 (taxol) 纳米颗粒。将此药物的制剂对小鼠异种移植的 MX-1 人乳腺肿瘤模型进行实验。在小鼠皮下种植 MX-1 乳腺肿瘤，当肿瘤长到大约 150- 300mg 时开始治疗。因肿瘤生长 12 天可达到上述指标，故在移植后第 13 天开始治疗。

紫杉醇纳米颗粒作为生理盐水中的混悬液以 20mg/kg 的剂量治疗携瘤小鼠，给予团块静脉内注射，连续给药 5 天。治疗组有 5 只动物。5 只动物的对照携瘤组用按同样方法，但仅接受生理盐水。随时间监视



肿瘤的大小。对照组的肿瘤重量显示极大的增加。这一组的动物均在第 28 天至 39 天之间将其处死。而治疗组显示有显著的效果，在第 25 天所有的动物均未发现可测肿瘤。这一组的动物在第 39 天全部处死时，均未发现复发的迹象，也没有肿瘤的迹象。结果见图 1。

实施例 15 用紫杉醇纳米颗粒治疗类风湿性关节炎动物模型

用胶原诱导的 Louvain 大鼠关节炎模型来检测微紫杉醇纳米颗粒对关节炎的治疗效果。通过监视实验动物爪子的大小来评估关节炎的严重程度。

关节炎完全发生后（一般在胶原注射后第 9-10 天），将动物分组分别接受紫杉醇纳米颗粒 1mg/kg q.o.d 和紫杉醇纳米颗粒 0.5mg/kg+ 强的松 0.2mg/kg q.o.d（联合治疗），腹腔内注射共 6 个剂量，然后每周一个剂量共 3 周。在治疗开始时（0 天）及每次注射药物时测量爪子的大小。仅接受生理盐水的一组作为对照。在实验结尾，接受紫杉醇纳米颗粒的这组的爪子缩小 42%，联合治疗组动物的爪子缩小 33%，而对照组动物的爪子增大 20%。关节炎诱导前的初始爪子大小为 50%。结果见图 2。

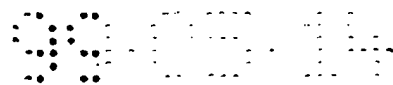
结论：紫杉醇纳米颗粒对关节炎具有治疗效果。为了避免因长期使用紫杉醇和类固醇的副作用，最好选择联合用药，这样可以得到同样的效果，但每种药物剂量可以减半。

例 16 纳米颗粒在体内的定位

通过将特定定位物质例如蛋白质、抗体、酶、肽、低核苷酸、糖、聚糖等掺入到纳米颗粒的外层蛋白包衣结合，就可将药物定位到身体的某一特定部位。这种定位能力可用于治疗或诊断。

例 17 用不同材料制备的静脉内输送系统

用于制备静脉内输送系统的材料可以是聚合物（例如聚乙烯、聚乙烯、聚丙烯管子等）或者玻璃。已知标准的医用等级管在其内表面包含疏水物质。因此这些物质能与注射溶液接触。的确，与导管一样，



这种管特制使疏水物质与治疗溶液接触，以便减少管对水溶性材料的吸收。然而治疗液内的任何疏水物质很可能与导管壁和输送系统的其它组分结合。因而，疏水药理活性剂的相当一部分在导管和输送容器的内壁可能被滞留。因此，由于疏水药理活性物质的相当一部分被导管吸收，因而疏水药理活性剂的剂量不稳定。在紧急治疗处理中当该疏水药理活性剂用于治疗疾病时，活性剂有效剂量的明显减少能导致治疗失败。当使用要求活性剂超过一定水平的治疗物质时，这种失败尤为明显，因而缩小了治疗范围。

最近已研究出静脉内导入这类疏水药理活性剂的新方法。通过与生物相容包衣的疏水部分（例如白蛋白）接触保护活性剂的疏水部分，活性剂附着于导管上趋势明显减小。因此本发明使得疏水性药物能与标准医用聚合物和疏水玻璃器械一起使用，其中药物得到了保护，因而不会被吸收到表面上。本发明的方法包括在疏水性药物外层安置一种生理相容聚合物保护性包衣（例如白蛋白），并将得到的组合物置入疏水聚合物输送系统中。因而本发明方法能改进各种疏水性治疗剂的输送。

例 18 治疗剂的静脉内给药

治疗剂（例如药物、造影剂等）的静脉内给药使该治疗剂至少有一个通道易于进入肝脏。由于该治疗剂是通过肝脏过滤，治疗剂的主要部分被肝脏摄取和滞留，因此，不能全身分布。并且，治疗剂一旦被肝脏摄取，就可能被新陈代谢，并且产生的代谢副产物通常具有普遍的系统毒性。通过将该药物或其它治疗剂封装入本发明的包衣内（例如用如白蛋白的蛋白质），可以减少肝脏对静脉内给药的滞留作用。例如，已知白蛋白能通过肝脏，并广泛地分布于病人全身。因此，肝脏对白蛋白的滞留不至于达到与毒性化合物或药物相同的程度，这些毒性化合物或药物具有肝脏受体（或其它机制），它们将启动导致它们被清除出血液的过程。通过用生理相容聚合物的包衣（例如，人体白蛋白包衣）保护该治疗剂，然后药物绕过肝脏并广泛地分布在所有器官系统中。根据本发明的一个方面，本发明提供了一种绕过肝脏的新方法，它包括将药物封入人体肝脏白蛋白（本质上是一种生理成分）。按

该方法，更多的药物能用于全身性治疗。除了药物的生物利用度增加以外，还降低了肝细胞的药物降解的代谢副产品的产生。肝脏旁路的增加和药物代谢副产品的减少改善了药物全体协同效果。这种改善药效可以推广到所有被封入到人白蛋白中的药物和物质。

实施例 1 9 降低药物的骨髓抑制作用和全身毒性作用

由于骨髓抑制作用，一些化学治疗药物具有剂量限制毒性。紫杉醇是这种药物的一个典型例子。当按目前被批准的 cremphor/乙醇制剂投药时，紫杉醇将产生限制重复给药的骨髓抑制作用。为了使病人的血细胞计数恢复正常，至少需 3 周停止对病人的治疗。已经假定由于本发明的药物载体（即人白蛋白）的非毒性相容性质，骨髓抑制的毒副作用可以显著降低。

分别将紫杉醇的商品制剂（由 Bristol Myerts Squibb (BMS) BMS 提供，cremaphor/乙醇）或本发明方法制备的紫杉醇（例如带白蛋白的纳米颗粒）投入 SD 大鼠 (Sprague Dawley Rats) 体内。两种制剂均经尾静脉输入。BMS 制剂用单一剂量水平 5 mg/kg 投药，本发明制剂 (Capxol) 用两种剂量水平 5mg/kg 和 12mg/kg 投药。投药后每天监控大鼠的白细胞计数，作为骨髓抑制的指标。

结果发现用 BMS 制剂 (5mg/kg) 的大鼠，WBC 计数在用药后第一天和第二天分别下降 47.6% 和 63.5%，而用 5mg/kg 的 Capxol 制剂，WBC 计数在第一天和第二天分别增加 14.7% 和 2.4%。对 12mg/kg 的大剂量 Capxol，WBC 计数在第一天和第二天分别增加 6.5% 和 3.6%。

这些结果表明，通过用本发明制剂投药，短期骨髓抑制作用显著降低。

全身毒性的另一指标是动物的体重。投药紫杉醇后对大鼠的体重进行了监测。剂量为 5mg/kg 时，BMS 制剂导致大鼠在投药后三天内体重下降 10.4%，而在本发明的制剂 (Capxol) 中投入同样剂量的紫杉醇，大鼠体重仅下降 3.9%，说明本发明制剂的毒性显著降低。

实施例 20 纳米颗粒制剂的团块剂量的给药

紫杉醇这种抗癌药，在含有 Cremaphor/乙醇的商品 BMS 制剂中不能以静脉内团块方式投药。这是由于载体的广泛毒性导致严重过敏反应的，接受这种药物的病人需要用类固醇激素和抗组胺药等预先治疗。BMS 制剂以静脉内输注给药需持续 1—24 小时。相比之下本发明的制剂由于无毒载体的使用，能以静脉内团块方式（即在 1 小时之内输注）容易地给患者投药，不会产生当今临床使用的 BMS 制剂所发现的对患者的副作用问题。

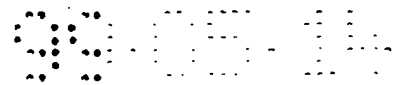
紫杉醇对患者典型的有效剂量一般为 200—500mg，视病人的体重或体表面积而改变。BMS 制剂必须以 0.6mg/ml 的最终输液浓度的给药，因而需要大输注体积（一般大约为 300—1000ml）。而本发明制剂（例如 Capxol）没有这些限制，能以希望的浓度给药。这使得临床医生能够在少至几分钟内用快速静脉内团块给药方式治疗患者。例如，如果将本发明的制剂再构成至 20mg/ml 的剂量浓度，总剂量为 200—500mg 的输注体积各自只有 10—25ml。这是临床实践中巨大的优点。

实验例 21 与商用 Cremaphor /乙醇制剂相比，纳米颗粒制剂中紫杉醇的毒性降低

众所周知紫杉醇这种抗癌药物，其商用 Cremaphor /乙醇 BMS 制剂具有广泛的毒性，可引起严重过敏反应，并且接受这种药物的患者需要预先用类固醇激素和抗组胺药等治疗。将 BMS 制剂的毒性与本发明纳米颗粒制剂的毒性进行了比较。

因此，将这些制剂以不同剂量给 C57BL 小鼠通过尾静脉进行静脉内注射，并通过对注射后小鼠进行全身观察监测毒性作用。

对 BMS 制剂，30mg/kg 的剂量致使小鼠在静脉内给药 5 分钟内一齐死亡。用同样剂量本发明的纳米颗粒制剂未见明显的毒性作用。剂量 103mg/kg 的纳米颗粒制剂表现出小鼠体重有一定程度下降，然而甚至如此大的剂量仍未有小鼠死亡。剂量大约为在 1000mg/kg、800mg/kg



和 550mg/kg 时小鼠均死亡，但死亡的时间不同，分别从几小时到 24 小时。故本发明制剂的致死剂量大于 103mg/kg，但小于 550mg/kg。

因此，本发明的紫杉醇制剂致死剂量远远高于商用 BMS 制剂。这在临床实践上具有重要意义，可以用更大的剂量投入化学治疗药物，以在毒性显著降低的同时得到更有效的癌细胞溶解活性。

实施例 22 用高压匀浆制备环孢菌素的纳米颗粒（静脉用 Capsorine）

将 30mg 环孢菌素（Cycloporine）溶于 3.0ml 二氯甲烷中。然后将溶液加入到 27.0ml 人血清白蛋白（1% w/v）中。混合物在低 RPM 下匀浆 5 分钟（Vitris 匀浆器，型号：Tempest I.Q.）形成粗乳剂，然后将之转移到高压匀浆器内（Avestin）。乳化在 9000-18000psi 下进行，乳状液至少再循环 5 个循环。将得到的系统放到回转蒸发器内，在 40 °C 低压（30mmHg）下蒸发 20-30 分钟使二氯甲烷迅速除去，所得分散体是半透明的，并且所得环孢菌素颗粒的一般尺寸为 160-220(Z-平均，Malvern Zetasizer)。

将分散体进一步低压冻干 48 小时，不需加任何防冻剂。通过加入蒸馏水或生理盐水，所得饼块能容易地复原到原来的分散体，复原后颗粒大小与冻干前一样。

实施例 23 用高压匀浆制备环孢菌素纳米小滴（口服 Capsorine）

将 30mg 环孢菌素溶于 3.0ml 适合的油中（含 10% 橙油的芝麻油）。然后将该溶液加入到 27.0ml 人血清白蛋白（1% w/v）中。该混合物在低 RPM 下匀浆 5 分钟（Vitris 匀浆器，型号：Tempest I.Q.），形成粗乳剂，然后转移到高压匀浆器内（Avestin）。乳化作用在 9000-18000psi 下进行，乳状液至少再循环 5 个循环。所得分散体的一般直径为 160-220(Z-平均，Malvern Zetasizer) 的。

分散体可直接使用，或根据需要加入适当的防冻剂低压冻干 48 小时。通过加入无菌水或生理盐水，所得饼块能容易地再构成原始分散

体。

实施例 2 4 静脉内给药后环孢菌素的纳米颗粒制剂（静脉用 Capsorine）的药物动力学（PK）数据与环孢菌素静脉用 Sandimmune,（目前由 Sandoz 经销的制剂）的比较

将按照上述实施例 22 和 23 制备的环孢菌素的纳米颗粒（静脉用 Capsorine）在生理盐水中再构成，并通过静脉内团块投药于第一组 3 只 SD 大鼠。将用生理盐水稀释后的静脉用 Sandimmune（含有 Cremaphor/乙醇）给第二组大鼠 3 只投药。每组大鼠接受同样的剂量 2.5mg/kg。分别在 0、5、15、30 分钟, 1、2、4、8、24、36 和 48 小时采血样。用 HPLC 分析血样中环孢菌素的水平，并测定典型的 PK 参数。PK 曲线显示典型经时的衰退趋势，结果见下表：

		经时衰退	
		AUC, mg-hr/ml	C _{最大} , ng/ml
Capsorine	静脉用	12, 228	2, 853
Sandimmune	静脉用	7, 791	2, 606

另外，由于静脉用 Sandimmune 制剂的毒性，该组中有两只（2/3）大鼠在用药后 4 小时内死亡，所以与目前可从商业渠道得到的制剂（静脉用 Sandimmune）相比，本发明的纳米颗粒制剂（静脉用 Capsorine）显示出更高的 AUC 并且无毒性。

实施例 25 环孢菌素纳米小滴(口服 Capsorine) 与 Neoral(目前由 Sandoz 经销的制剂)口服后药物动力学（PK）数据的比较

上面制备的环孢菌素纳米小滴加入到橙汁中,管饲给第一组的 3 只 SD 大鼠。第二组的 3 只大鼠同样管饲以橙汁稀释后的 Neoral（一种可从商业渠道得到的含有乳化剂的微乳状液制剂）。每组接受在相同橙汁容量中的的相同剂量(12mg/kg)。分别在 0、5、15、30 分钟, 1、2、4、8、24、36 和 48 小时采血标本。采用 HPLC 测定血中环孢菌素水平，并确定典型的药物动力学参数。药物动力学曲线显示典型的经时

衰减，结果如下：

	经时衰减	
	AUC, mg-hr/ml	C _{最大} , ng/ml
Capsorine Oral	3,195	887
Neoral	3,213	690

因此，本发明的纳米小滴制剂(口服 Capsorine)的 P K 行为与从商业渠道得到的制剂 (Neoral) 相似。

尽管已参考了一些优选实施方案本对发明作了详细说明，但应理解修饰和变化是在所说明的和要求的精神和范围之内。



种植后天数

处理前后爪子大小

